Journal of Iranian Plant Protection Research
https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 3, Fall 2023, p. 259-273

Effect of Nutritional Supplements on Some Biological and Physiological Parameters of *Graphosoma lineatum* L.

R. Farshbaf Pourabad [1*], H. Esparani Asadi [2], D. Mohammadi [3]

Received: 21-02-2023
Revised: 30-05-2023
Accepted: 31-05-2023
Available Online: 06-06-2023

How to cite this article:
Farshbaf Pourabad, R., Esparani Asadi, H., & Mohammadi, D. (2023). Effect of nutritional supplements on some biological and physiological parameters of *Graphosoma lineatum* L. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *37*(3), 259-273. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2023.81220.1132

Introduction

The striped bug, *Graphosoma lineatum* L. is one of the pests of Apiaceae family such as parsley, carrot, celery and some medicinally important plants. The adults and nymphs of this insect feed on seeds of host plants. The eggs of the striped bug have an important role in mass rearing program of some parasitoids. Nutritional supplements undertake an essential function in mass rearing of insects and increase the efficiency of production. Vitamins such as B group have different functions in physiology of insects. The growth and development of insects hinge on acquiring essential nutrients through food materials. Apart from their primary food source, insects rely on essential amino acids and certain minerals for proper nutrition. These crucial components must be obtained from their food sources. Symptoms of nutritional deficiency, as reported in various research studies, include delayed growth, weight loss, prolonged immature stages, increased mortality, wing deformities, alterations in mating behaviors, and various physiological issues. In this study the effects of some vitamins and amino acids on anatomy of salivary glands, total protein of body, developmental time and fecundity of *G. lineatum* were evaluated in controlled conditions.

Material and Methods

Insects reared on parsley seeds adhered on the inner side of big plastic containers in controlled condition. Supplements including vitamins B_{12}, B_6, B_1 and Serine and Phenylalanine amino acids selected for evaluation. These supplements used for the treatmnet of *G. lineatum* in four different concentrations dissolved in water. For evaluating the effects of nutritional supplements on anatomy of salivary glands, both glands separate after dissection of adult's thorax, and dimension of glands including width and length of posterior and anterior lobs, measured by micrometer apparatus located on stereomicroscope. Total body protein measured by Kjeldahl apparatus after well drying the total body of insects in oven followed by fine powder of dry materials. Total protein was determined using a standard method, calculated by multiplying the nitrogen amounts by 6.38, a constant value. In distinct experiments, the impact of nutritional supplements on the duration of each nymphal stage was investigated. One-day-old eggs were employed for this purpose. Following treatment justification, the time required for the development of each instar was recorded on a daily basis. All tests were replicated three times, with distilled water used for the control treatment. The data were analyzed by One-way ANOVA

1- Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ege University, 35100 izmir, Turkiye
(*- Corresponding Author Email: rfpourabad@tabrizu.ac.ir & reza.farshbaf.pourabad@ege.edu.tr)
2- M.Sc. in Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
https://doi.org/10.22067/jpp.2023.81220.1132

experimental randomized design and Duncan's multiple range test using SAS software used for comparing the means.

Results and Discussion

The results disclosed a significant impact of all vitamins and amino acids on all studied parameters. Notably, in the case of salivary glands, the posterior lobe exhibited a more pronounced effect in insects fed with B1, B6, and Phenylalanine. Different concentrations of vitamin B_6, B_1 and Phenylalanine affected total protein content of male and female insect's body. Vitamin B_{12} had non-significant effect on male and female total body protein. Nutritional supplements changed the rate of laid and hatched eggs in addition with nymph's developmental time. Vitamin B_{12} in the concentration of 0.005 g/l, B_6 in the concentration of 0.25 g/l, B_1 in the concentration of 0.5 g/l, Serine and Phenylalanine both in the concentration of 0.5 g/l showed the highest rate of laid and hatched eggs. Vitamin B_6 and B_1 in the concentration of 1 and 1.5 g/l resulted in prolonging the nymph's life span in comparing with controls. The negative effects of high concentrations of nutritional supplements on fecundity and normal developmental period of nymphs well documented in this study. Metabolism, cell division, hormone synthesis, enzymes activity and many physiological parameters affects by supplements especially vitamins. Any disorder in utilization, absorption and inhibition of their function leads to biological and behavioral problems in insects. In some cases, the function of symbionts for compensation essential supplements documented.

Conclusion

The results of this study indicate important function of vitamins B_{12}, B_6 and B_1 on *G. lineatum* nymphal developmental period. In high concentrations, rate of growth decreased in comparison with controls. Salivary glands anatomy showed some changes in dimensions especially in posterior lobs in dose-depending manner. Number of eggs laid and hatched decreased especially in high concentrations of nutritional supplements. The results of this study will help to justify better meridic diet for rearing striped bug. In semi-artificial diets for rearing this insect, corporation of little concentrations (optimum) will improve the fitness of insects.

Keywords: Biological parameters, Phenylalanine, Salivary glands, Vitamin B

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۷ شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲، ص. ۲۷۳-۲۵۹

تأثیر مکمل غذایی بر چند ویژگی فیزیولوژیک و زیست‌شناختی سن نواری چتریان، *Graphosoma lineatum* L.

رضا فرشباف پورآباد[1*]- هانیه اسپرانی اسدی[2]- داود محمدی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰

چکیده

سن نواری چتریان *Graphosoma lineatum* L. یکی از آفات مهم گیاهان تیره چتریان است. حشرات کامل و پوره‌های این سن از بذر گیاهان میزبان خود تغذیه می‌کنند. از تخم‌های این حشره برای تولید انبوه زنبورهای پارازیتوئید نیز استفاده می‌شود. در پرورش انبوه حشرات مکمل‌های غـذایی نقش بسزایی در افزایش کارایی تولید دارند. در این بررسی تأثیر برخی ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه بر ریخت‌شناسی غده بزاقی، میزان پروتئین کل بدن، طول دوره رشدی و زادآوری این حشره در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. سن‌ها بر روی بذرهای گیاه جعفری که بـه دیـواره داخلـی ظـروف پـرورش چسبانده شده بودند پرورش یافتند. مکمل‌های مورد مطالعه شامل ویتامین‌های B_{12}، B_6، B_1 و اسید آمینه‌های سرین و فنیل آلانین بودند. این مکمل‌ها به‌صورت محلول در آب مورد استفاده برای پرورش سن، در چهار غلظت مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی تاثیر مکمل‌ها بر غدد بزاقی، پس از تشریح و خارج کردن این غدد ابعاد آن‌ها شامل طول و عرض لوب‌های جلویی و عقبی با استفاده از استریومیکروسکوپ و میکرومتر اندازه‌گیـری شـد. پروتئین کل بدن با روش کلدال پس از خشک کردن حشرات در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد. در بررسی دیگری، طول دوره رشدی پنج سن پورگی سن نواری چتریان تحت تاثیر مکمل‌های غذایی مختلف اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که مورفولوژی غدد بزاقی تحت تاثیر مکمل‌های غذایی تغییرات معنی‌داری پیدا کرد. ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه مورد استفاده بیشتر لوب عقبی غدد بزاقی را تحت تأثیر قرار دادند و کاهش معنـی‌داری در ابعـاد لـوب های غدد بزاقی در مقایسه با شاهد ثبت گردید. همچنین، غلظت‌های مختلف ویتامین‌های B_6، B1 و اسید آمینه فنیـل آلانـین بیشـترین تـأثیر را روی میزان پروتئین کل بدن حشرات نر و ماده داشتند. ویتامین B_{12} روی تغییر درصد پروتئین کل بدن در دو جنس نر و ماده تأثیر معنـی‌داری نداشـت ولـی درصد پروتئین کل بدن در غلظت‌های بالا از غلظت‌های پایین بیشتر بود. نتایج بررسی‌های زیستی نیز نشان داد که افـزودن مکمـل‌هـای غـذایی روی میانگین تعداد تخم‌های گذاشته شده و تفریخ شده و طول دوره‌های سنین پورگی تأثیر معنی‌داری داشت. مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف مکمل‌های غذایی نشان داد که تغذیه از ویتامین‌های B_{12}، B_6 و B_1 به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۰۰۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر و اسیدهای آمینه سرین و فنیل آلانین با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر بالاترین زادآوری و درصد تفریخ تخم را داشتند. میزان تفریخ تخم‌ها در مقایسه با تیمار شاهد در تمام تیمارها کـاهش نشـان داد. با مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای به‌کار رفته، غلظت بالای ویتامین‌های B_6 وB_1 (۱ و ۱/۵ گرم در لیتر) باعث افزایش طول دوره های پورگی گردید. در مطالعه حاضر مشخص گردید که تغذیه از برخی مکمل‌های غذایی بر درصد تفریخ تخم‌ها و طول دوره رشدی سن نواری چتریان تاثیر منفی داشت.

واژه‌های کلیدی: سرین، فراسنجه‌های زیستی، فنیل آلانین، غدد بزاقی، ویتامین B

۱- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: rfpourabad@tabrizu.ac.ir)
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

https://doi.org/10.22067/jpp.2023.81220.1132

مقدمه

مواد غذایی مورد استفاده حشرات از لحاظ کمیت و کیفیت باید نیازهای غذایی آن‌ها را تامین و رشد و تولید مثل حشره را تضمین نماید. این مواد غذایی اغلب توسط تغذیه وارد بدن می‌شوند که یا به طور مستقیم یا بر اثر واکنش‌های آنزیمی و متابولیسمی تغییر می‌یابند و مورد استفاده قرار می‌گیرند. هر چند کربوهیدرات‌ها به‌عنوان منبع اصلی انرژی حشرات گیاه‌خوار شناخته شده‌اند ولی پروتئین‌ها و لیپیدها نیز در نشوونمای حشرات نقش مستقیمی دارند. در این بین برخی مواد معدنی، ویتامین‌ها و املاح هستند که، هر چند به‌مقدار اندک مورد نیاز هستند، اما نشوونما و تولید مثل حشرات وابسته به آن‌هاست (Kraus *et al*., 2019;Genc, 2006). ویتامین‌ها به‌عنوان مهم‌ترین بخش از گروه‌های مختلف مواد غذایی، هر چند به مقدار بسیار کم مورد نیاز هستند، ولی بدون دریافت آنها زیست‌شناسی و فیزیولوژی حشرات دچار اختلال خواهد شد. این گروه از مواد غذایی یا مستقیما از طریق تغذیه، سنتز و یا با استفاده از همزیست‌های حشرات دریافت می‌شوند. ویتامین‌ها به دو گروه قابل حل در آب و قابل حل در چربی تقسیم می‌شوند. ویتامین‌های قابل حل در آب مانند ویتامین‌های گروه B نمی‌توانند در بدن ذخیره شوند و پیوسته باید تامین شوند (Kraus *et al*., 2019). بیشتر حشرات برای نشو ونما به ویتامین‌های قابل حل درآب نیاز دارند (Genç, 2006). این ویتامین‌ها شامل تیامین (B_1)، ریبوفلاوین (B_2)، اسید نیکوتنیک (B_3)، پایریدوکسین (B_6)، اسید پانتوتنیک، اسید فولیک و بیوتین برای نشو و نما و تولید مثل حشرات ضروری هستند و نقش‌های مختلفی مانند کوآنزیم، افزایش متابولیسم، مقابله با تنش‌های زیست‌محیطی، رفتار و دیاپوز به آن‌ها نسبت داده شده است (Cohen, 2015; Douglas, Genç, 2006 ; 2017). مشخص شده که تیامین، ریبوفلاوین و نیاسین در بیوسنتز ATP نقش دارند. همچنین ویتامین‌های پانتوتنات در انتقال گروه آسیل، و بیوتین و فولیک اسید به‌عنوان فاکتور رشد در حشرات نقش دارند (Kraus *et al*., 2019).

در بررسی‌های مختلف، ضرورت وجود ویتامین‌های گروه B برای نشوونمای عادی پشه‌ها (Kleinjan and Dadd, 1977)، و B6 برای رشد مناسب غدد ابریشم‌ساز، توازن اسیدهای آمینه همولنف و دفع عادی اسید اوریک در کرم ابریشم (Hori *et al*., 1966) گزارش شده است. فاروکی (Faruki, 2005) اظهار کرد که ویتامین B_6 در متابولیسم پروتئین‌ها به‌عنوان کوآنزیم نقش دارد و باعث افزایش رشد حشرات می‌شود. فقدان ویتامین B_{12} در غذای حشرات رشد را کند و میزان طول عمر حشرات کامل را کاهش می‌دهد (Dadd, 1985 ; Genc, 2006). در برخی حشرات، برخی ویتامین‌های گروه B توسط همزیست‌های دستگاه گوارش سنتز می‌شوند (Salem *et al*., 2014).

ویتامین B در حشرات نقش دفاعی نیز دارد (Yoshii *et al*., 2019). ویتامین B_1 یا تیامین در سنتز ATP و تولید انرژی در حشرات نقش بسیار مهمی را بر عهده دارد (Serrato-Salas and Gendrin, 2022).

پروتئین‌ها نیز به‌عنوان ترکیباتی حیاتی که نقش‌های بسیار متنوعی را در بدن موجودات زنده ایفا می‌کنند شناخته شده‌اند. نقش های مختلف ساختمانی، منبع انرژی، عامل اصلی حرکت، انتقال ترکیبات مختلف در خون یا همولنف، هورمون‌ها، آنزیم‌ها، گیرنده‌های مختلف، دیاپوز، فرومون‌ها و رفتار و تمام واکنش‌های متابولیسمی بدن حشرات به نوعی با پپتیدها، اسیدهای آمینه و یا پروتئین‌ها در ارتباط هستند (Zanotto *et al*., 2010;Kraus *et al*., 2019). ارزش غذایی یک ماده پروتئینی تابع ترکیب کیفی و کمی اسیدهای آمینه آن می‌باشد. نیاز به اسیدهای آمینه بر حسب گونه و مرحله زیستی حشره فرق می‌کند (Li *et al*., 2020). آرژنین، هیستیدین، لوسین، ایزولوسین، لایزین، متیونین، فنیل آلانین، ترئونین، تریپتوفان و والین اسیدهای آمینه ضروری بدن هستند که فقدان هر کدام از این اسیدهای آمینه باعث اختلال در نشو و نمای حشرات می‌شود (Mirth *et al*., 2020). آلانین و سرین دو اسید آمینه دیگر هستند که برای رشد مطلوب اغلب حشرات ضروری می‌باشند (Liu *et al*., 2017). مطالعاتی که روی سوسری آمریکایی، *Periplaneta Americana* (Linnaeus, 1758) انجام گرفت نشان دادکه با کم کردن پروتئین از رژیم غذایی این سوسری، طول عمر آن در مقایسه با شاهد کاهش یافت (Genc, 2006). پروتئین‌ها همچنین در ساخت و استحکام جلد بدن حشرات نقش بسیار مهمی دارند (Merzendorfer and Zimoch, 2003).

روبل و همکاران (Robel *et al*., 1995) میزان پروتئین کل برخی سن‌های خانواده Miridae را بیشتر از ۷۰ درصد وزن خشک بدن و سن‌های بذرخوار دو خانواده Lygaeidae و Delphasidae را ۵۶-۵۴ درصد وزن خشک بدن گزارش کردند. میانکبا و همکاران (Miankeba *et al*., 2022) درصد پروتئین کل بدن حشرات مختلف مورد بررسی را ۴۳ الی ۵۳ درصد وزن خشک گزارش کردند که عدد قابل تامل و بزرگی است. این موضوع موید اهمیت پروتئین در بدن حشرات است. گزارش شده است که وجود ویتامین‌های مختلف در غذای حشرات اثرات معنی‌داری بر تجمع پروتئین در بدن آنها دارد. مشخص گردیده است که اسید فولیک، اسید نیکوتنیک و بیوتین باعث افزایش سطوح پروتئین زنبور (L) *Pimpla turionella* شده و با کاهش دوزهای کلسیم پانتوتنات و پایریدوکسین از میزان پروتئین کل بدن کاسته شد (Sulanc and Emre, 2000).

غدد بزاقی سن نواری چتریان از نظر شکل و ساختار بسیار متنوع هستند، با وجود این یک ویژگی مشترک دارند یعنی در هر طرف بدن

یک غده اصلی و یک غده ضمیمه وجود دارد. این غدد معمولاً در قفس‌سینه و در دو طرف روده قرار دارند اما ممکن است در داخل سر قرار گرفته و یا وارد فضای شکم شوند. در گونه‌های مختلف ممکن است نسبتاً ساده یا به شدت پیچیده و منشعب باشند (Baptist, 1941). بنا به اظهار هوری (Hori, 1967)، اندازه غدد بزاقی *Lygus disponsi* Linnavuori, 1961 در مراحل مختلف نشوونمایی متفاوت است. غدد بزاقی در سن‌ها که قطعات دهانی مکنده دارند نقش بسیار مهمی در امر تغذیه دارند. با توجه به ماهیت قطعات دهانی و هضم خارج دهانی، وجود بزاق به‌عنوان مرطوب کننده، نرم‌کننده، حل‌کننده، رقیق‌کننده و گوارش‌دهنده اهمیت بسیار زیادی دارد (Reis 2003 ,.Emilano and *et al*؛ 2007 ,.Azevedo *et al*؛ Bonning, 2020). غدد بزاقی نقش‌های مختلف دیگری نیز در حشرات مختلف دارند: تولید تارهای ابریشمی، تولید فرومون‌ها، تنظیم فشار اسمزی، دفاع در مقابل ترکیبات سمی و بیمارگرها و ضد انعقاد خون به‌عنوان نقش‌های مختلف این غدد گزارش شده‌اند (Ribeiro, 1995؛ 2014 ,.Martínez *et al*؛ 2007 ,.Azevedo *et al*؛ Celerio-Mancera and Labavitch, 2016). در صورت صدمه دیدن و یا هر تغییری در غدد بزاقی نقش آن‌ها دچار اختلال می‌شود و حشرات از نظر فیزیولوژیک، رفتاری و زیستی دچار اختلال خواهند شد (Castellanos *et al*., 2017;Ramm *et al*., 2015). با توجه به این که در سن‌ها غدد بزاقی از قسمت‌های مختلف تشکیل شده‌اند و هر کدام نقش‌های متفاوتی را در ترکیب نهایی بزاق بر عهده دارند، بروز هر گونه تغییر مورفولوژیک و یا ناهنجاری در ساختمان این غدد می‌تواند بسته به مرحله زیستی حشره به ایجاد اختلال در ایفای نقش این غدد منجر شود (Koçakoğlu and Cossolin *et al*., 2019؛ Candan, 2022).

سن *Graphosoma lineatum* از آفات مهم تیره چتریان مانند جعفری، گشنیز و هویج می‌باشد که در ایران از استان‌های مختلفی گزارش شده است. همچنین از این سن در پرورش انبوه زنبورهای پارازیتوئید سایر سن‌ها مانند سن گندم به‌عنوان میزبان آزمایشگاهی استفاده می‌شود (Roversi *et al*., 2018). با توجه به این مطلب، در بررسی حاضر، اثر تغذیه از مکمل‌های غذایی شامل چند ویتامین و اسید آمینه روی ریخت‌شناسی غده بزاقی و نیز میزان پروتئین کل بدن در حشرات کامل نر و ماده این سن مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، اثر آنها بر برخی ویژگی‌های زیستی مانند طول دوره رشدی، زادآوری ماده‌ها و درصد تفریخ تخم‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش سن نواری چتریان

حشرات کامل سن نواری چتریان از کلنی پرورشی در انسکتاریوم گروه گیاهپزشکی دانشگاه تبریز تهیه و یک کلنی جدید شکل گرفت. قبل از انجام آزمایش‌های اصلی، حشره تا پنج نسل بر روی دانه‌های جعفری خالص‌سازی شد.

ابتدا دانه‌های جعفری جهت ایجاد یکنواختی الک شدند. سپس جهت حذف ناخالصی‌ها و دانه‌های پوک، داخل آب ریخته شده و بلافاصله پس از حذف ناخالصی‌های سطحی، دانه‌های باقیمانده در کف ظروف در شرایط آزمایشگاهی در مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. دانه‌های آماده شده جهت مصارف بعدی در ظروف سربسته نگهداری شدند. جهت پرورش حشرات از ظروف پلاستیکی درپوش‌دار مات به ابعاد ۸×۲۲×۳۰ سانتی‌متر (ظروف پرورش) و ۳۰×۳۲×۴۵ سانتی‌متر (ظروف تخم‌گیری) استفاده شد. به‌منظور ایجاد تهویه در ظروف پرورشی، بخشی از سطح فوقانی درپوش برداشته و با پارچه توری مسدود گردید (شکل ۱). در دیواره‌های طولی و در ارتفاع ۴ سانتی‌متری از کف ظروف چهار شکاف افقی به‌طول ۴ سانتی‌متر و عرض یک میلی‌متر تعبیه گردید که محل قرار دادن نوارهای کاغذ صافی به‌طول ۱۵و عرض ۵ سانتی‌متر بود. یک سانتی‌متر از این نوارها از طریق شکاف به داخل ظروف پرورش وارد می‌شد. نوارهای کاغذ صافی با جذب آب از ظروف پلاستیکی آب مورد نیاز سن‌ها را در اختیار آن‌ها قرار می‌دادند.

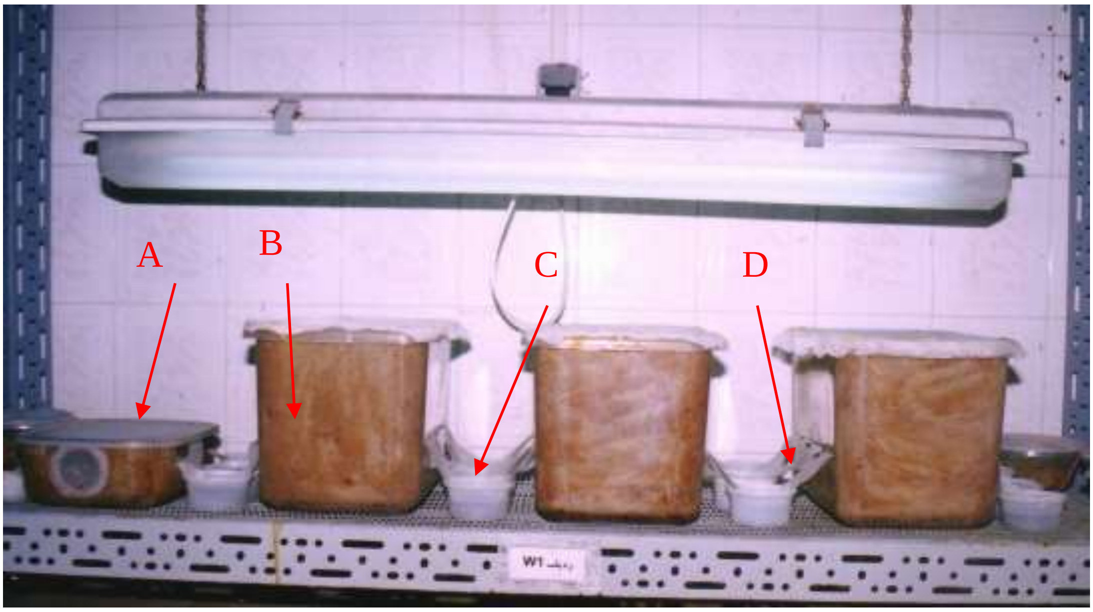
جهت تغذیه پوره‌ها و حشرات کامل از دانه‌ها جعفری، چسب طبیعی سریشم به‌صورت یک لایهٔ یکنواخت به کف و دیواره‌های داخلی ظروف پرورش مالیده می‌شد و دانه‌های جعفری در داخل ظروف ریخته می‌شدند و طوری عمل می‌گردید تا تمام سطوح داخلی آن‌ها با دانه‌های جعفری پوشانیده شود. سپس اجازه داده می‌شد تا سریشم در مجاورت هوای آزاد خشک شود. ظروف مورد استفاده هر ۱۵ روز یک بار تعویض می‌شدند. شرایط پرورش در انسکتاریوم شامل دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد و دورهٔ نوری ۱۶:۸ (L:D) ساعت بود (Yazdanian *et al*., 2011).

مکمل‌های غذایی مورد بررسی

در این پژوهش از ویتامین‌های B_1 (تیامین)، B_6 (پایریدوکسین) و B_{12} (کوبال‌آمین) و اسیدهای آمینه سرین و فنیل آلانین استفاده شد که همگی حالت پودری داشتند.

ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه ذکر شده هر کدام در ۴ غلظت و ۴ تکرار مورد استفاده قرار گرفتند و برای هر کدام یک تیمار شاهد (آب مقطر) در نظر گرفته شد. ویتامین B_1 در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۵ گرم در لیتر، ویتامین B_6 در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در لیتر، ویتامین B_{12} در غلظت‌های ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۲ گرم در لیتر و اسیدهای آمینه سرین و فنیل آلانین هر دو در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت‌های مختلف ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه در آب مقطر تهیه

شدند. سپس در اختیار پوره‌های سن اول به بعد سن قرار گرفته و ویژگی‌های مختلف زیستی در حشرات کامل و پورهای سنین مختلف ثبت گردید.



شکل ۱- ظروف پلاستیکی مورد استفاده در پرورش آزمایشگاهی سن *Graphosoma lineatum*: (A) ظروف پرورش، (B) ظروف تخم‌گیری، (C) ظرف آب مقطر، (D) فیلتر کاغذی تعبیه شده

Figure 1- Plastic containers used for laboratory rearing of *G. lineatum*: (A) Rearing plastic container; (B) egg harvesting container, (C) Distilled water container; (D) Filter paper

تشریح و خارج ساختن غدد بزاقی حشرات کامل

غدد بزاقی حشرات کامل به روش یزدانیان و همکاران (Yazdanian *et al*., 2006) از بدن آن‌ها خارج شدند. در این روش حشرات در داخل ظروف پتری که کف آن با یک لایه پارافین جامد پوشانیده شده بود به پشت قرار گرفته و توسط یک سوزن که به قسمت میانی شکم آن‌ها وارد می‌شد، ثابت گردیدند. سپس اسکلریت های بین پیش‌ران‌های پاهای جفت اول و دوم توسط دو نوک یک پنس که در مجاورت هم نگه داشته شدند، شکسته شد به‌طوری که با این کار اتصال پیش‌قفس‌سینه به ناحیه عقبی خود بسیار سست گردید. بعد از این کار دو نوک پنس به اندازه عرض پیش‌قفس‌سینه باز و در کناره‌های آن فرو برده شد و پیش‌قفس‌سینه به آرامی به دور از شکم کشیده شد. با این کار غدد بزاقی و مجاری مربوطه از روده جدا شده و درداخل پیش‌قفس‌سینه قرار گرفتند. سپس غدد بزاقی از بدن جدا و از نظر ریخت شناسی مورد بررسی قرار گرفتند شدند.

بررسی ریخت‌شناسی غده بزاقی

غدد بزاقی پس از جدا شدن از بدن حشرات کامل نر و ماده به دو گروه غده اصلی سمت راست و غده اصلی سمت چپ تقسیم شدند. طول و عرض قسمت‌های مختلف غدد بزاقی با استفاده از میکرومتر کالیبره و نصب شده بر روی استریومیکروسکوپ بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. طول لوب‌های جلویی و عقبی از هایلوس[1] تا انتهای هر لوب و در امتداد خط مستقیمی که هایلوس را به انتهای لوب متصل می‌کند، و عرض لوب‌های جلویی و عقبی نیز در عریض‌ترین قسمت آن دو اندازه‌گیری شد (Yazdanian *et al*., 2006) (شکل ۲).

تعیین میزان پروتئین کل بدن حشرات کامل

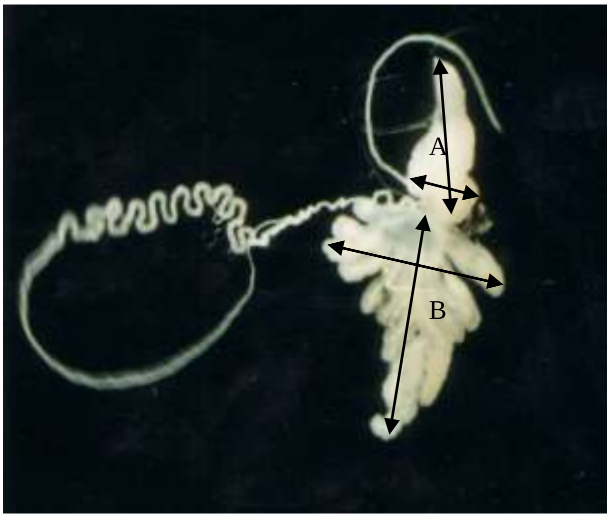
برای تعیین پروتئین کلی بدن از روش کلدال[2] استفاده شد. حشرات کامل نر و ماده مرده پس از خشک شدن کامل به شکل پودر درآورده شدند. مقدار ۰/۲گرم از نمونه‌های خشک شده بدن سن‌ها توزین و با اسید سولفوریک غلیظ و کاتالیزور (سولفات مس + سولفات پتاسیم) مورد هضم قرار داده شد. ازت نمونه‌های هضم شده پس از رقیق شدن با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دستگاه کلدال مدل ® Foss2300 Kjeltec اندازه‌گیری شد. برای محاسبه پروتئین کل از ضریب ۶/۲۵ استفاده شد (Kamizake *et al*., 2003).

1- Hilus
2- Kjeldahl

بررسی ویژگی‌های زیستی

طول دوره‌های سنین مختلف پورگی

پس از تخم‌گذاری حشرات ماده تغذیه کرده از مکمل‌های غـذایی و تفریخ شدن تخم‌ها، ۲۰ عدد پوره سن اول ۲۴ ساعته در هـر تکـرار مورد بررسی قرار گرفتند. مدت زمان لازم بـرای تکمیـل هـر یـک از مراحل پورگی به تفکیک هر سن با توجه به وجود پوسته‌های تعویض جلد از طریق نمونه‌برداری‌های روزانه تعیین شد.



شکل ۲- نحوه اندازه‌گیری طول و عرض قسمت‌های مختلف غده بزاقی سن *G. Lineatum*

طول و عرض لوب جلویی (A)، طول و عرض لوب عقبی (B)

Figure 2- Measuring method for the salivary glands dimensions of *G. lineatum*

Posterior lobe length and width (A), anterior lobe length and width (B)

زادآوری و درصد تفریخ تخم‌ها

برای تخم‌گیری، یک عدد حشره ماده و دو عدد حشره نر به داخل ظروف آزمایش استوانه‌ای به ارتفاع ۱۲ و قطر دهانـه ۱۰ سـانتی‌متـر انتقال داده شدند. سن نواری چتریان تخم‌های خود را به‌صورت دسـته ای بر روی در پوش‌های پارچه توری قرار می‌داد. تخم‌هـای گذاشـته شده توسط حشرات ماده بر روی پارچه توری روزانه شمارش می‌شدند. این شمارش تا زمان مرگ حشرات ماده ادامه داشت. به‌منظور محاسبه میزان تفریخ تخم‌ها، دسته‌های تخم روزانه بررسی و پوره‌هـای ظـاهر شده از ظروف حذف می‌شدند. شمارش پوره‌هـا تـا روز دهـم پـس از شروع تخمگذاری ادامه یافت. در نهایت درصد تفریخ تخم‌ها محاسـبه گردید. آزمایش‌ها در سه تکرار و در هر تکرار تعـداد ۷ حشـره مـاده و ۱۴ حشره نر مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه آماری

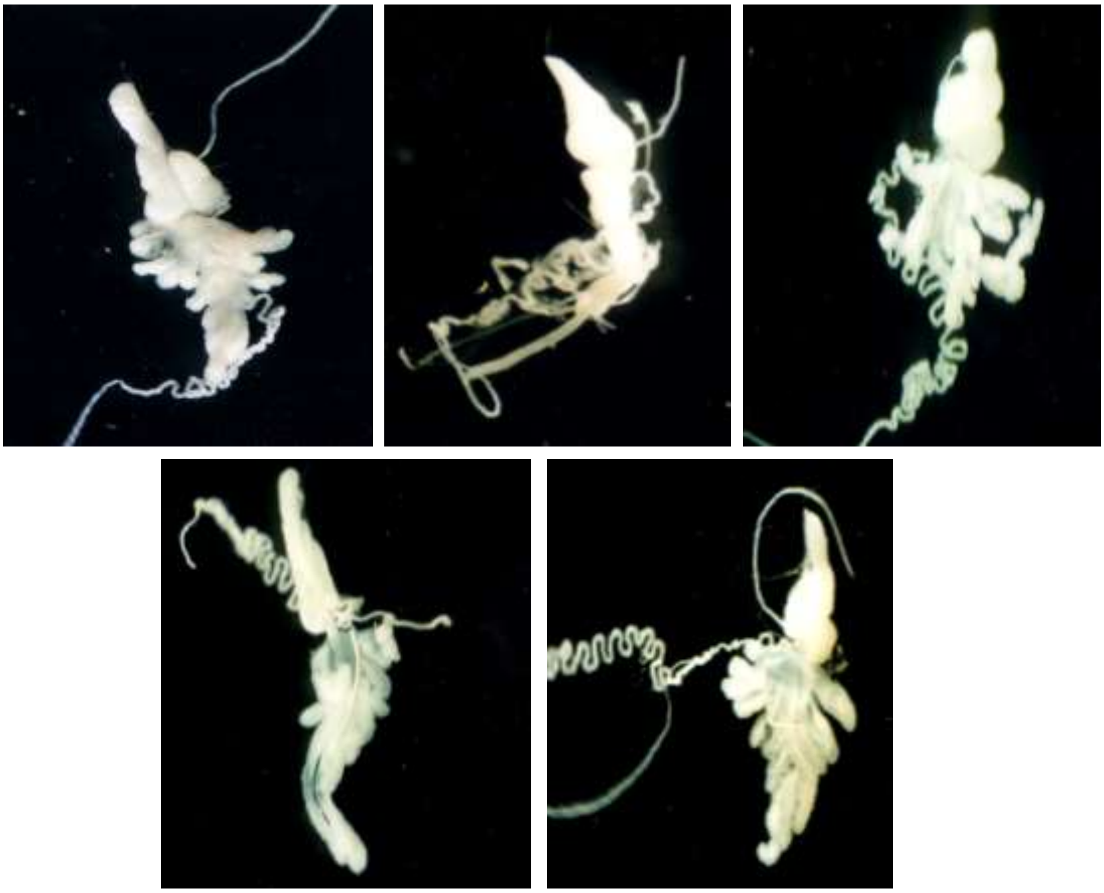
پیش از تجزیه واریانس، نرمال بودن داده‌های حاصل بررسی شـد و در صورت نیاز تبدیل داده مناسب انجام شـد. داده‌هـا بـا اسـتفاده از نرم‌افزار آماری SAS به‌صورت طرح کاملا تصـادفی بـا چهـار تکـرار تجزیه واریانس (یک طرفه) شدند. مقایسه میـانگین‌هـا نیـز بـه روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج

تأثیر مکمل‌های غذایی بر ریخت‌شناسی غده بزاقی

طبق نتایج، تغذیه حشـرات کامـل از مکمـل‌هـای غـذایی مـورد بررسی روی شکل و اندازه غدد بزاقی تاثیر داشت. لوب عقبی این غدد در حشرات مختلف و تیمارهای مختلف بیشتر از سایر بخش‌ها تحـت تاثیر قرار گرفت (شکل ۳).

در هر دو جنس نر و ماده، اثر تیمارهـای مـورد بررسـی بـر رشـد طولی و عرضی لوب‌های جلـویی و عقبـی غـدد براقـی سـن نـواری چتریان معنی‌دار بود. در حشرات ماده (جدول ۱) بیشترین انـدازه ابعـاد غدد در تیمار شاهد ثبت گردید و سایر تیمارها نیـز بسـته بـه غلظـت مورد استفاده اثرات متفاوتی داشتند و معمـولا تغذیـه از غلظـت‌هـای بالاتر مکمل‌ها باعث کاهش بیشتر ابعاد غدد شد.



شکل ۳- تأثیر تغذیه پوره‌ها از مکمل‌های غذایی بر ریخت‌شناسی غده بزاقی حشرات کامل ظاهر شده سن *G. lineatum*

به‌ترتیب A تا E: ویتامین B_{12}، ویتامین B_6، ویتامین B_1، اسید آمینه سرین و شاهد

Figure 3- Effect of nutritional supplements consumption by nymphs on salivary glands dimensions of emerged adults of *G. lineatum*

A-E respectively: B12, B6, B1, Serine amino acid and control

تغذیه پوره‌ها از مکمل‌های غذایی موجب تغییرات مورفومتریک در غدد بزاقی حشرات کامل نر شد (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که غلظت‌های بالای مکمل‌ها اثرات بیشتری در کاهش اندازه لوب‌های جلویی و عقبی سن‌ها داشتند. ابعاد غده بزاقی در تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری بیشتر از تیمار با مکمل‌های غذایی بود.

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه (جداول ۱ و ۲) نشان داد که در کلیه تیمارهای به‌کار رفته بجز تیمار شاهد، تغذیه از پایین‌ترین سطح غلظت همیشه بیشترین اثر را بر روی رشد طول و عرض لوب جلویی در نر و ماده گذاشته است. اما غلظت های متفاوت و نوع رژیم‌های غذایی به‌کار برده شده اثرات متفاوتی را بر روی طول و عرض لوب عقبی در نر و ماده داشته است.

اگر چه غلظت‌های پایین تیمارها در مجموع اثرات نسبتا مشابهی در رشد و اندازه طول و عرض لوب عقبی درحشرات نر و ماده داشته اند. اما اثرات متفاوت این نوع رژیم‌های غذایی بر روی رشد طول و عرض لوب عقبی چه در حشرات نر و چه در حشرات ماده مشاهده شد.

درصد پروتئین کل بدن

طبق نتایج، اثر تغذیه از ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه مورد بررسی بر درصد پروتئین کل بدن در حشرات ماده ($F_{4,15}$= 36.199, $p<0.0001$) و نر ($F_{4,15}$= 19.182, $p<0.0001$) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین درصد پروتئین کل بدن در سن‌های تغذیه کرده از مکمل‌های غذایی مختلف در جدول ۳ خلاصه شده است.

جدول ۱- اثر تغذیه پوره‌های سن *G. lineatum* از مکمل‌های غذایی مختلف بر اندازه طول و عرض قسمت‌های مختلف غده بزاقی حشرات کامل ماده ظاهر شده

Table 1- Effects of different nutritional supplements consumption by nymphs on width and length of emerged Female *G. lineatum* salivary glands different parts

تیمارها Treatments	غلظت‌ها(گرم در لیتر) Concentrations (g/l)	عرض لوب عقبی Posterior lobe width (mm)		طول لوب عقبی Posterior lobe length (mm)		عرض لوب جلویی Anterior lobe width (mm)		طول لوب جلویی Anterior lobe length (mm)	
		راست Right	چپ Left	راست Right	چپ Left	راست Right	چپ Left	راست Right	چپ Left
B_{12}	0.02	1.17e	1.16cd	1.58gh	1.58b-f	0.69c-f	0.68b-d	1.35a-d	1.22b-f
	0.015	1.31e	1.27cd	2.22b-d	2.22a	0.8a-d	0.7b-d	1.29a-d	1.31b-e
	0.01	1.38de	1.33cd	2.29a-d	2.43a	0.88ab	0.85a	1.32a-d	1.24a-f
	0.005	1.86bc	1.86b	2.50ab	2.43a	0.90a	0.78a	1.35 a-d	1.38a-e
B_6	1	2.01ab	2.01ab	1.5gh	1.45c-f	0.49g	0.44g	1.11d-f	1.14e-f
	0.75	2.02ab	2.02ab	1.47gh	1.47b-f	0.52g	0.49g	1.20c-f	1.17c-f
	0.5	2.07ab	2.07ab	2.01c-e	1.83b	0.54g	0.49g	1.22b-e	1.22b-f
	0.25	2.31a	2.29a	2.38ab	2.41a	0.88g	0.50g	1.54 a	1.59a
B_1	1.5	1.22e	1.06d	1.33h	1.92f	0.55e-g	0.58d-g	1.02ef	1.10ef
	1	1.37de	1.11cd	1.43gh	1.28f	0.60e-g	0.59d-g	1.20cf	1.25b-f
	0.75	1.42de	1.48c	1.48gh	1.30ef	0.62e-g	0.64c-e	1.31a-d	1.44a-c
	0.5	1.94bc	1.95ab	2.23b-d	1.78bc	0.81a-c	0.79a-c	1.47 ab	1.35a-e
Serine	2	1.26e	1.05d	1.74e-g	1.56b-f	0.47g	0.46g	0.97ef	1.01f
	1.5	1.17e	1.14cd	1.63f-h	1.56b-f	0.47g	0.46g	0.96f	0.99f
	1	1.17e	1.16cd	16.8e-h	1.67b-e	0.72b-e	0.69b-d	1.13d-f	1.14ef
	0.5	1.35de	1.29cd	2.33a-c	2.26a	0.79a-d	0.81ab	1.45 a-c	1.31b-e
Phenylalanine	2	1.10e	1.07d	1.4gh	1.39b-f	0.68c-f	0.63d-f	1.27b-d	1.16d-f
	1.5	1.16e	1.16cd	1.53gh	1.45c-f	0.68c-f	0.7b-d	1.42a-c	1.42a-d
	1	1.17e	1.13cd	1.61f-h	1.59b-f	0.72b-e	0.81ab	1.47ab	1.45b
	0.5	1.66cd	1.37cd	1.96d-f	1.72b-d	0.78a-d	0.91a	1.48 ab	1.46ab
Control	-	2.30a	2.26a	2.61a	2.46a	0.93a	0.91a	1.47ab	1.46ab

در هر ستون، حروف مشابه به‌معنی عدم اختلاف معنی‌دار است (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، ۰/۰۱ = α).

The same letters in each column considers statistically non-significant (Duncan's multiple range test, α=0.01).

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه مورد استفاده در هر دو جنس نر و ماده نشان می‌دهد که تغذیه از غلظت‌های مختلف ویتامین B_6 بیشترین تأثیر را بر افزایش درصد پروتئین کل بدن سن نواری چتریان گذاشتند (جدول ۳). مکمل غذایی فنیل آلانین نیز در غلظت ۲ گرم بر لیتر اثری مشابه با ویتامین B_6 در هر دو جنس نر و ماده داشتند و موجب افزایش معنی‌داری در میزان پروتئین کل بدن در سن نواری چتریان شدند (جدول ۳). هرچند با کاهش غلظت این اسید آمینه در جنس نر، کاهش معنی‌داری در درصد پروتئین کل سن‌ها مشاهده شد. ویتامین B_{12} کمترین تأثیر را در درصد پروتئین کل در هر دو جنس نر و ماده داشت (جدول ۳). این موضوع بخصوص در حشرات نر بسیار معنی‌دار و حتی از تیمار کنترل بدون مکمل غذایی هم کمتر بود. اسید آمینه سرین و ویتامین B_1 در مقایسه با سایر تیمارها اثر متوسطی روی پروتئین کل داشتند.

اثر تغذیه از مکمل‌های غذایی روی فراسنجه‌های زیستی

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تغذیه پوره‌ها از ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه مورد بررسی روی زادآوری ماده‌های ظاهر شده، درصد تفریخ تخم‌های آن‌ها و نیز طول دوره سنین مختلف پورگی در پوره‌های حاصل از تخم‌ها (به‌جز پوره سن اول) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

زادآوری و درصد تفریخ تخم

با مقایسه میانگین تاثیر تغذیه از مکمل‌های غذایی مختلف بر زادآوری و درصد تفریخ تخم‌های سن نواری چتریان (جدول ۴) مشاهده شد که ویتامین B_{12} در غلظت ۰/۰۰۵ گرم بر لیتر، ویتامین B_6 در غلظت ۰/۲۵گرم بر لیتر، ویتامین B_1 در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر و اسیدهای آمینه سرین و فنیل آلانین در غلظت ۰/۵گرم بر لیتر، بالاترین تاثیر را بر میزان تخم گذاشته شده و تفریخ شده داشتند. با افزایش غلظت هر یک از ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه کاهش معنی

داری در تعداد تخم گذاشته شده و تفریخ شده توسط سن‌های تیمار شده مشاهده گردید. اثر ویتامین‌های B_1، B_6 و B_{12} مشابه اثر اسیدهای آمینه سرین و فنیل آلانین بوده و هیچ‌کدام بر دیگری برتری نداشت (جدول ۴).

جدول ۲- اثر تغذیه پوره‌های سن *G. lineatum* از مکمل‌های غذایی مختلف بر اندازه طول و عرض قسمت‌های مختلف غده بزاقی حشرات کامل نر ظاهر شده

Table 1- Effects of different nutritional supplements consumption by nymphs on width and length of emerged male *G. lineatum* salivary glands different parts

تیمارها Treatments	غلظت‌ها (گرم در لیتر) Concentrations (g/l)	عرض لوب عقبی Rear lobe width (mm)		طول لوب عقبی Rear lobe length (mm)		عرض لوب جلویی Front lobe width (mm)		طول لوب جلویی Front lobe length (mm)	
		راست Right	چپ Left	راست Right	چپ Left	راست Right	چپ Left	راست Right	چپ Left
B_{12}	0.02	1.3d-f	1.22c-e	1.92ef	1.46g-j	0.73ab	0.69ab	1.03de	0.94d
	0.015	1.45b-d	1.45a-d	1.59ef	1.51g-i	0.73ab	0.69a-c	1.12b-e	1.14a-d
	0.01	1.46b-d	1.47a-c	1.6ef	1.82c-f	0.69ab	0.67a-d	1.26b-e	1.34ab
	0.005	1.52b	1.5ab	2.08b	1.91b-d	0.73ab	0.73a	1.53a	1.37a
B_6	1	1.17fg	1.18e	1.49fg	1.44h-j	0.41f	0.4i	1.18b-e	1.18a-d
	0.75	1.23e-g	1.27b-e	1.51fg	1.5g-j	0.44f	0.42hi	1.19b-e	1.2a-d
	0.5	1.34c-f	1.39b-e	1.56fg	1.55g-j	0.55f-h	0.51f-h	1.34a-c	1.31a-c
	0.25	1.48 bc	1.43b-e	1.69c-f	1.7d-g	0.8a	0.71a	1.36ab	1.32a-c
B_1	1.5	1.2e-g	1.42b-e	1.43fg	1.6f-h	0.56d-g	0.56d-g	1.09b-e	1.06b-d
	1	1.2e-g	1.45a-d	1.67d-f	1.56g-i	0.61b-g	0.59b-g	1.09b-e	1.09a-d
	0.75	1.3d-f	1.48ab	1.72c-f	1.66e-h	0.67a-f	0.61a-f	1.11b-e	1.15a-d
	0.5	1.44 b-d	1.5ab	1.96bc	1.72d-g	0.69a-e	0.65a-e	1.18b-e	1.18a-d
Serine	2	1.21e-g	1.17e	1.28g	1.26j	045g-i	0.48g-i	1.04d-e	1.02cd
	1.5	1.22e-g	1.2de	1.87b-e	1.87b-e	0.52f-h	0.52f-h	1.02e	1.05b-d
	1	1.21e-g	1.22c-e	1.91b-d	1.9b-e	0.57e-g	0.55eg	1.07cd	1.06b-d
	0.5	1.25e-g	1.25b-e	2.11ab	2.1b	0.57c-g	0.57c-g	1.20b-e	1.15a-d
Phenylalanine	2	0.96h	0.91f	1.31g	1.33i-j	0.67a-e	0.64a-e	1.16b-e	1.18a-d
	1.5	1.10gh	0.92f	1.5fg	1.46g-j	0.71ab	0.69ab	1.17b-e	1.16a-d
	1	1.26e-g	1.18e	1.91b-d	1.94b-d	0.7ab	0.69ab	1.26b-e	1.25a-c
	0.5	1.38b-e	1.38b-e	1.96bc	2.03bc	0.72ab	0.69ab	1.35ab	1.33ab
Control	–	1.71a	1.69a	2.35a	2.34a	0.71ab	0.71ab	1.3a-d	1.3a-d

در هر ستون، حروف مشابه به‌معنی عدم اختلاف معنی‌دار است (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، ۰/۰۱ = α).

The same letters in each column considers statistically non-significant (Duncan’s multiple range test, α=0.01).

طول دوره سنین مختلف پورگی

سن نواری چتریان در پرورش با کلیه مکمل‌ها، دارای پنج سن پورگی بود. با مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای به‌کار رفته طبق جدول ۴ مشاهده می‌شود، غلظت بالای ویتامین B_6 و B_1 (۱ و ۱/۵ گرم بر لیتر) باعث افزایش طول دوره‌های پورگی شده است. اما اختلاف ما بین نوع تیمارهای به‌کار رفته (ویتامین‌ها در مقابل اسیدهای آمینه) مشاهده نشد. به‌طوری که اثر هر یک از مکمل‌های غذایی به‌کار رفته بر طول سنین مختلف پورگی یکسان می‌باشد.

بحث

در بررسی حاضر افزودن مکمل‌های غذایی به رژیم غذایی سن *G. lineatum* و تغذیه حشره در دوره پورگی از آن‌ها بر ابعاد غده بزاقی حشرات کامل ظاهر شده هر دو جنس اثرات معنی‌داری داشت. به‌طور کلی، تغذیه از غلظت‌های بالاتر مکمل‌ها باعث کوچک‌تر شدن اندازه غدد بزاقی شد. ابعاد غدد بزاقی در مقایسه با تیمار شاهد بخصوص در غلظت‌های بالای مکمل‌های غذایی کوچکتر بود. بدشکلی‌ها و تغییر در ابعاد عادی قسمت‌های مختلف حشرات تحت تاثیر دو عامل مهم شرایط پرورش و موادی است که حشرات از آن‌ها تغذیه می‌کنند. این تغییرات مشاهده شده به ژن‌های دخیل در تقسیم سلولی برمی‌گردد که سطح آنزیم‌ها، هورمون‌ها، متابولیسم را بیان یا خاموشی ژن‌های دخیل را تحت تاثیر قرار می‌دهند. ترکیب غذا به عنوان فاکتوری بسیار مهم در نشو و نمای حشرات نقش بسیار مهمی در این خصوص ایفا می‌کند (Seyedalmoosavi *et al*., 2022).

جدول ۳- مقایسه تاثیر تغذیه پوره‌های سن *G. lineatum* از مکمل‌های غذایی مختلف بر درصد پروتئین کل بدن حشرات کامل نر و ماده ظاهر شده

Table 3- Comparing effects of different nutritional supplements consumption by nymphs on total protein percentage male and female *G. lineatum* emerged adults

تیمارها Treatments	درصد پروتئین کل بدن در حشرات کامل نر Male total protein percent	درصد پروتئین کل بدن در حشرات کامل ماده Female total protein percent
B_{12}	46.5±4.2 ij	48.92±3.2h
	45.14±3.5j	46.69±2.4i
	45.47±3.5j	45.96±2.5i
	45.74±4.2j	46.19±2.5i
B_6	59.63±5.4a	60.42±3.1a
	59.99±5.4a	59.87±2.6ab
	59.25±2.4b	59.58±2.4ab
	58.77±3.2ab	59.65±3.6ab
B_1	57.62±3.4bc	58.32±3.6bc
	53.73±3.1ef	55.23±2.4d
	51.18±3.2g	52.95±2.5eg
	49.02±2.6h	51.4±2.4g
Serine	52.71±3.2fg	54.67±3.1ed
	52.49±3.2fg	54.91±4.2ed
	51.59±4.2g	53.7±4.6ed
	51.08±2.4g	52.65±4.2ed
Phenylalanine	59.51±2.4a	60.33±2.3a
	57.75±3.4bc	59.11±3.2ab
	56.58±2.5cd	58.94±3.4ab
	55.13±3.2de	56.94±2.6c
Control	48.74±3.4hi	48.86±4.2h

در هر ستون، حروف مشابه به‌معنی عدم اختلاف معنی‌دار است (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، $\alpha = ۰/۰۱$).

The same letters in each column considers statistically non-significant (Duncan’s multiple range test, α=0.01).

ویتامین‌های گروه B بخصوص در فعالیت آنزیم‌های مختلف نقش به سزایی دارند و تکثیر سلولی عادی نیازمند مقادیر کافی و متوازن از هر گروه از مواد غذایی است. اختلال و کمبودهای موجود در گروهی از مواد غذایی بخصوص در حشرات دارای دوره رشدی کوتاه، بر رشد عادی اندام‌های داخلی و خارجی بدن آن‌ها اثرات سوئی دارد (Offor, 2010). تاثیر ترکیبات سمی بر آناتومی غدد بزاقی نیز در مطالعاتی گزارش شده است. مارتینز و همکاران (Martínez *et al*., 2014) نشان دادند که در سن *Podisus nigrispinus* تیمار سن‌ها با حشره‌کش اسپاینوسد موجب تغییرات موفولوژیک در غدد بزاقی شده و بافت غدد بزاقی در مقایسه با تیمار شاهد تغییراتی در تجمع ملانین، تکثیر سلولی و غیره داشته است. با توجه به اهمیت و نقش بسیار مهم غدد بزاقی در سن‌ها هر نوع تغییر آناتومیکی می‌تواند منجر به وقوع اثرات زیستی و فیزیولوژیکی گردد.

در بررسی حاضر که سطوح مختلفی از مکمل‌های غذایی مورد بررسی قرار گرفته است دوزهای پایین اثرات مثبت و دوزهای بالاتر اثرات منفی بر برخی ویژگی‌های زیستی سن نواری چتریان نشان داد. درصد پروتئین کل بدن به‌عنوان فاکتور مهم تحت تاثیر مکمل‌های غذایی قرار گرفته است. پروتئین نقش بسیار مهمی در ساختمان، نشو و نما، متابولیسم، دگردیسی و تقریبا در تمام ویژگی‌های زیستی و فیزیولوژیکی حشرات ایفا می‌کند (Le gall and Behmer, 2014). بیشترین میزان پروتئین کل با کاربرد ویتامین B_6 و فنیل آلانین مشاهده گردید و با افزایش غلظت‌های آسیدآمینه سرین و ویتامین B_1 بر مقدار پروتئین کل بدن افزوده شد. ویتامین B_{12} تأثیری در مقدار پروتئین ایجاد نکرد. سولانس و امر (Sulanc and Emre, 2000) در بررسی تأثیر ویتامین B_6 بر درصد پروتئین کل زنبور *Pimpla turionella* نتیجه گرفتند، با کاهش غلظت‌های به‌کار رفته ویتامین، از میزان پروتئین کل بدن کاسته می‌شود. در بررسی حاضر نیز با کاهش غلظت‌های به‌کار رفته ویتامین B_6 از میزان پروتئین کل بدن سن نواری چتریان کاسته شد.

همچنین بررسی حاضر نشان داد که افزودن مکمل‌های غذایی شامل ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه ذکر شده اثرات معنی‌داری را بر تعداد تخم‌های گذاشته شده و تفریخ شده سن *G. lineatum* داشتند. با افزایش غلظت هر کدام از مکمل‌های غذایی کاهش معنی‌داری در تعداد تخم گذاشته شده مشاهده شد. در یک بررسی مشخص گردید

که پایریدوکسین (B6) تاثیر معنی‌داری بر کاهش زاداوری در کرم ابریشم داشت و با افزایش غلظت زادآوری به میزان بیشتری کاهش یافت (Faruki, 2005). همچنین خلیستوسکی و آلفیمو (Khlisyovskii and Alfimov, 1979) اظهار داشتند که اضافه شدن اسید آسکوربیک به ماده غذایی، باعث افزایش طول دوره‌های پورگی در سن *G. lineatum* می‌شود. در بررسی حاضر در غلظت های بالای ویتامین‌های B_1 و B_6 در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها طول دوره‌های پورگی افزایش نشان داد.

جدول ٤- تأثیر تغذیه پوره‌های سن نواری چتریان از مکمل‌های غذایی روی برخی فراسنجه‌های زیستی پوره‌ها و حشرات کامل

Table 4– Effects of nutritional supplements consumption by nymphs on some biological parameters of *G. lineatum* adults and nymphs

تیمار Treatments	غلظت Concentration (g/l)	تعداد تخم گذاشته شده Produced eggs	تعداد تخم تفریخ شده Hatched eggs	طول دوره* پوره سن ۲ 2nd instar life span	طول دوره پوره سن ۳ 3rd instar life span	طول دوره پوره سن ٤ 4th instar life span	طول دوره پوره سن ٥ 5th instar life span
B_{12}	0.02	37hi**	20g	5c	6c	7.25b	8c
	0.015	56f	36e	5c	6c	7b	8c
	0.01	78c	56.2bc	5c	6c	7b	8c
	0.005	84a	62.8a	5c	6c	7b	8c
B_6	1	28.25j	11.8h	6a	7a	8a	9a
	0.75	39.5h	19g	5.5b	6c	7.8a	9a
	0.5	74.2d	54c	5c	6c	7.2b	8c
	0.25	82.7ab	61.5a	5c	6c	7b	8c
B_1	1.5	25.3 i	15.2gh	6a	7a	8a	8a
	1	25.5 g	29.8f	5.2bc	6c	7b	8.25b
	0.75	75.7 de	49d	5c	6c	7b	8c
	0.5	84.2a	62.5a	5c	6c	7b	8c
Serine	2	50g	28.2f	5c	6c	7b	8c
	1.5	58.2f	37e	5c	6c	7b	8c
	1	71.5de	49.2d	5c	6c	7b	8c
	0.5	79.7 bc	58.5abc	5c	6c	7b	8c
phenylalanine	2	50.5g	29f	5c	6c	7b	8c
	1.5	59.2f	37.7e	5c	6c	7b	8c
	1	70e	47.5d	5c	6c	7b	8c
	0.5	80.5abc	59.2ab	5c	6c	7b	8c
control	-	71e	65a	5c	6c	7b	8c

*واحد طول دوره رشدی به روز محاسبه شده است.

** در هر ستون، حروف مشابه به‌معنی عدم اختلاف معنی‌دار است (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، $\alpha = ۰/۰۱$)

*life span unit calculated as days

** The same letters in each column considers statistically non-significant (Duncan's multiple range test, α=0.01).

در مطالعات مختلف تاثیر ریبوفلاوین و بیوتین در زاد و ولد حشرات مختلف گزارش شده است. در مگس سرکه، مگس میوه، ملخ‌ها و برخی حشرات دیگر مشخص شده است که حذف همزیست های تولید کننده ویتامین موجب کاهش معنی‌داری در تعداد تخم حشرات مذکور می‌شود. علاوه بر کاهش زادآوری، باروری نیز تحت تاثیر قرار گرفته و درصد تفریخ تخم‌ها کاهش یافته است (Serrato-Salas and Gendrin, 2022). همچنین گزارش شده است که، اضافه کردن ریبوفلاوین و بیوتین به جیره غذایی ساس موجب بهبود نشو و نما و تولید مثل آن شده است (Moriyama *et al.*, 2015). در بررسی مشابهی اسمیت و همکاران (Smith *et al.*, 2007) نشان دادند که اضافه کردن بیوتین در رژیم غذایی مگس سرکه موجب افزایش باروری و طول دوره رشدی شده است. وزن لاروهای تغذیه کرده از مکمل بیوتین در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان داده ولی این تاثیر در حشرات نر و ماده یکسان نبوده و ماده‌ها به میزان ۱۳ درصد کمتر از حشرات نر، محتوای چربی بدن افزایش یافته است. ولی در حشرات ماده میزان پروتئین همولنف در اثر تغذیه از بیوتین بیشتر از حشرات نر افزایش یافته است. تفاوت در محتوای پروتئین در حشرات نر و ماده در بررسی حاضر نیز مشاهده شد. متیوز و همکاران (Matthews *et al.*, 2020)، نقش بسیار مهم ویتامین B_6 را در مقایسه با متیونین در طول دوره رشدی مگس سرکه نشان دادند. همچنین لندن‌برگر و همکاران (Landenberger *et al.*, 2004)، در بررسی خود نشان دادند که در مگس میوه، اضافه کردن

بیوتین موجب کاهش طول دوره رشدی می‌شود. با توجه بـه اهمیـت بیوتین در تقسیم میتوز در حشرات بـه‌نظـر مـی‌رسـد کـاهش میـزان دریافت این ویتامین اثرات مستقیمی بر نشو و نما و طول دوره رشدی مراحـل مختلـف سـنی حشـرات داشـته باشـد (Neophytou and Pitsouli, 2022).

ویتامین‌های گروه B نقش بسـیار مهمـی در متابولیسـم حشـرات دارند. کاهش معنی‌دار این گروه از ویتامین‌ها در رژیـم غـذایی اثـرات فیزیولوژیکی و بیولوژیکی متعددی در حشرات مختلف گذاشته اسـت، گزارش شده که نسبت جنسی در برخی حشرات بر اثر تغذیه از غلظت های مختلف ویتامین B تغییر می‌کند (Wang *et al*., 2020).

در مواردی مشخص شده است که غلظت‌های بالای مکمل‌هـای غذایی تأثیر سوء بر نشو و نما و فیزیولـوژی حشـرات داشـته و طـول عمر، زاد و ولد و بقا به شدت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف قرار دارد (Bouchebti *et al*., 2022). گزارش شده اسـت کـه بتـا آلانـین در غلظت بالا موجب کاهش طول دوره رشدی و رفتار جستجوگری زنبور *Vespa orientalis* شده است. در حالی که غلظت پایین این مکمـل تاثیر مثبتی در مقایسه با شاهد نشان داد. این محققان مشخص کردند که غلظت بالای پرولین و بتاآلانین برای حشرات سمی بوده و نه تنها اثرات مثبتی بر نشو و نمای زنبـور نداشـته اسـت بلکـه ویژگـی‌هـای زیستی به‌صورت منفی تحت تأثیر قرار گرفته است. ایـن ویتـامین‌هـا میزان تغذیه را هم تحت تأثیر قرار داده‌اند و در غلظت‌های بالا کاهش معنی‌داری در دریافت غـذا مشـاهده شـده اسـت. نتـایج مشـابهی در غلظت‌های بالای ویتامین‌های گروه B مورد مطالعه در بررسی حاضـر نیز مشاهده شد. با توجه به نتایج تحقیـق حاضـر و مطالعـات صـورت گرفته غلظت بهینه ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه در نشو و نما و تولیـد مثل حشرات ضروری است.

با توجه به مجموع اثرات بیولوژیک و فیزیولوژیک مشـاهده شـده در بررسی حاضر مشخص می‌گردد که مکمل‌های غـذایی در غلظـت مشخصی می‌توانند ویژگی‌های زیستی سن نـواری چتریـان را بهبـود بخشند و غلظت‌های بالا در مواردی تـاثیر عکـس داشـته و بیولـوژی حشره به‌صورت منفی تحت تأثیر قرار خواهد گرفت. زادآوری و درصد تفریخ تخم‌ها به‌شـدت تحـت تـأثیر مکمـل‌هـای غـذایی قـرار دارد. اسیدهای آمینه سرین و فنیل آلانـین در غلظـت‌هـای پـایین موجـب افزایش باروری شده ولی غلظت‌های بالای این مکمل نیز تأثیر سـوء بر باروری سن نواری چتریان گذاشته است. هر چند در منابع مختلـف اثرات مکمل‌های غذایی در تغییر طول دوره رشدی حشـرات گـزارش شده است ولی در بررسی حاضر مشخص شد کـه طـول دوره رشـدی پوره‌های سنین مختلف سن نواری چتریان در سنین مختلـف پـورگی بجز غلظـت‌هـای بـالای ویتـامین‌هـای B_1، B_6 و B_{12} تحـت تـأثیر مکمل‌های غذایی قرار نگرفتند. از مهم‌ترین نتایج تحقیق حاضر ایـن بود که پروتئین کل بدن در اسـتفاده از مکمـل‌هـای غـذایی افـزایش معنی‌داری نشان داده و در غلظت‌های بالا میزان ذخیره پروتئین بیشتر از غلظت‌های پایین و بخصوص تیمار شاهد بود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پـژوهش و فنـاوری دانشـگاه تبریز صورت گرفته است که از مسـاعدت آن معاونـت محتـرم کمـال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Azevedo, D., Zanuncio, J., Zanuncio, J., Martins, G., Marques-Silva, S., Sossai, & M., Serrão, J. (2007). Biochemical and morphological aspects of salivary glands of the predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *3*, 469-477. https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000300013
2. Baptist, B.A. (1941). The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. *Journal of Cell Sciences*, *2*(329), 91–139.
3. Bouchebti, S., Bodner, L., Bergman, M., Cohen, T.M., & Levin, E. (2022). The effects of dietary proline, β-alanine, and γ-aminobutyric acid (GABA) on the nest construction behavior in the Oriental hornet (*Vespa orientalis*). *Scientific Reports*, *12*, 7449, 1-8. https://doi.org/10.1038/s41598-022-11579-w
4. Castellanos, N., Martínez, L.C., Silva, E.H., Teodoro, A.V., Serrão, J.E., & Oliveira, E.E. (2017). Ultrastructural analysis of salivary glands in a phytophagous stink bug revealed the presence of unexpected muscles. *PLOS ONE*, *12*(6), 1-15.
5. Celorio-Mancera, P.M., & Labavitch, J. (2016). Salivary gland secretions of phytophagous arthropods. In: Cohen E., Moussian B. (eds) *Extracellular Composite Matrices in Arthropods. Springer*, Cham. 601-623.
6. Cohen, A.C. (2015). *Insect diets: Science and technology*. CRC Press.
7. Cossolin, J., Martínez, L., Pereira, M., Vivan, L., Bozdoğan, H., Fiaz, M., & Serrão, J. (2019). Anatomy, histology, and ultrastructure of salivary glands of the burrower bug, *Scaptocoris castanea* (Hemiptera: Cydnidae). *Microscopy and Microanalysis*, *25*(6), 1482-1490. https://doi.org/10.1017/S1431927619015010
8. Dadd, R.H. (1985). Nutrition: organism, In: Kerkut G., Gilbert L. (eds.). *Comprehensive insect physiology*,

biochemistry and pharmacology. 4, 313-390. Pergamon, Oxford.

9. Emiliano, C.P., & Bonning, B.C. (2020). Extraoral digestion: outsourcing the role of the hemipteran midgut. *Current Opinion in Insect Science*, *41*, 86-91. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.07.006
10. Faruki, S.I. (2005). Effect of pyridoxine on the reproduction of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* (Lep., Bombycidae), *International Studies Journal*, *2*, 28-31.
11. Genç, H. (2006). General principals of insects nutritional ecology. *Trakya Univercity Journal of Science*, *7*(1), 53-57.
12. Hori, K. (1967). Preliminary observations on the salivary glands of cabbage stink bug, *Eurydema rugosa* Motschulsky (Hem., Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology*, *2*, 187-194.
13. Hori, Y., Watanabe, K., & Ito, T. (1966). Nutrition of silkworm *Bombyx mori*. XIV. Further studies on the requirements for B vitamin. *Bulletin of Sericult Experimental Station*, *20*, 393-409.
14. Kamizake, N.K.K., Gonçalves, M.M., Zaia, C.TB.V., & Zaia, D.A.M. (2003) Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *16*, 507–16. https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00004-8
15. Khlistovskii, E.D., & Alfimov, V.A. (1979). The role of ascorbic acid in the feeding of the noxious pentatomid *Eurygaster integriceps* and the striped bug *Graphosoma lineatum* (L.) reared on artificial media. *Entomologicheskoe Obozyenie*, *58*, 233-239.
16. Kleinjan, J.E., & Dadd, R.H. (1977). Vitamin requirements of the larval mosquito, *Culex pipiens*. *Annals of Entomological Society of America*, *70*, 541-543.
17. Koçakoğlu, O., & Candan, S. (2022). Ultrastructural characterization of salivary glands, alimentary canal and malpighian tubules of the red shield bug *Carpocoris mediterraneus Tamanini*, 1958 (Heteroptera, Pentatomidae). *Microscopy and Microanalysis*, *28*(3), 824-836. https:/doi.org/10.1017/S1431927622000307
18. Kraus, S., Tamara, G-M., Mathieu, L., & Coline, M. (2019). Insect Diet. Vonk J., Shackelford T. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*, Springer, 1–9.
19. Landenberger, A., Kabil, H., Harshman, L.G., & Zempleni, J. (2004). Biotin deficiency decreases life span and fertility but increases stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *15*, 591–600.
20. Le Gall, D., & Behmer S.T. (2014). Effects of protein and carbohydrate on an insect herbivore: The vista from a fitness landscape, *Integrative and Comparative Biology*, *54*(5), 942–954. https://doi.org/10.1093/icb/icu102
21. Li, Y., Wang, S., Liu, Y., Lu, Y., & Wang, S. (2020). The effect of different dietary sugars on the development and fecundity of *Harmonia axyridis*. *Frontires in Physiology*, *11*, 1-12. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.574851
22. Liu, C., Du, B., Hao, F., Lei, H., Wan, Q., & He, G. (2017). Dynamic metabolic responses of brown planthoppers towards susceptible and resistant rice plants. *Plant Biotechnology Journal*, *15*, 1346–1357. https://doi.org/10.1111/pbi.12721
23. Martínez, L.C., Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., & Serrão, J.E. (2014). Ultrastructure and cytochemistry of salivary glands of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Protoplasma*, *251*, 535–543. https://doi.org/10.1007/s00709-013-0549-0
24. Matthews, M.K., Wilcox, H., Hughes, R., Veloz, M., Hammer, A., Banks, B., Walters, A., Schneider, K.J., Sexton, C.E., & Chaston, J.M. (2020). Genetic influences of the microbiota on the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(10), 1-17. https://doi.org/10.1128/AEM.00305-20
25. Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, *206*, 4393-412.
26. Miankeba, P., Taofic, A., Kiatoko, N., Mutiaka, K., Francis, F., Megido, C., & Protein, R. (2022). Content and amino acid profiles of selected edible insect species from the Democratic Republic of Congo Relevant for Transboundary Trade across Africa. *Insects*, *13*, 994. https://doi.org/10.3390/insects13110994
27. Mirth, C.K., Hall, M.D., & Piper, M.D.W. (2020). Amino acid quality modifies the quantitative availability of protein for reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104050
28. Moriyama, M., Nikoh, N., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2015). Riboflavin provisioning underlies Wolbachia's fitness contribution to its insect host. *mBio*, *10*(6), 1-8. https://doi.org/10.1128/mBio.01732-15
29. Neophytou, C., & Pitsouli, C. (2022). Biotin controls intestinal stem cell mitosis and host-microbiome interactions. *Cell Reports*, *38*, 1-36. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110505
30. Offor, E. (2010). The nutritional requirements of phytophagous insects: Why do insects feed on plants? *SSRN Electronic Journal*, 1-17.
31. Ramm, C., Wayadande, A., Baird, L., Nandakumar, R., Madayiputhiya, N., Amundsen, K., Donze-Reiner, T., Baxendale, F., Sarath, G., & Heng-Moss, T. (2015). Morphology and proteome characterization of the salivary glands of the western chinch bug (Hemiptera: Blissidae), *Journal of Economic Entomology*, *108*(4), 2055–2064.
32. Reis, M.M., Meirelles, R.M.S., & Soares, M.J. (2003). Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue & Cell*, *35*, 393-400.

33. Ribeiro, J.M.C. (1995). *Insect saliva: function, biochemistry, and physiology*. In: Chapman R.F., de Boer G. (eds) Regulatory mechanisms in insect feeding. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1775-7_3
34. Robel, R.J., Press, B.M., Hennig, B.L., & Johnson, K.W. (1995). Nutrient and energetic characteristics of sweepnet-collected invertebrates. *Journal of Field Ornithology*, *66*, 44-53.
35. Roversi, P.F., Maltese, M., Simoni, S., Cascone, P., Binazzi, F., Strangi, A., Sabbatini, G., & Guerrieri, E. (2018). *Graphosoma lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae): a suitable host for mass rearing *Ooencyrtus telenomicida* (Hymenoptera: Encyrtidae). *International Journal of Pest Management*, *64*, 294-302. https://doi.org/10.1080/09670874.2017.1403059
36. Salem, H., Bauer, E., Strauss, A.S., Vogel, H., Marz, M., & Kaltenpoth, M. (2014). Vitamin supplementation by gut symbionts ensures metabolic homeostasis in an insect host. *Proceeding of Royal Society, B 281*, 20141838. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1838
37. Serrato-Salas, J., & Gendrin, M. (2022). Involvement of microbiota in insect physiology: Focus on B Vitamins. *ASM Journals.* https://doi.org/10.1128/mbio.02225-22
38. Seyedalmoosavi, M.M., Mielenz, M., & Veldkamp, T. (2022). Growth efficiency, intestinal biology, and nutrient utilization and requirements of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae compared to monogastric livestock species: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *13*, 31. https://doi.org/10.1186/s40104-022-00682-7
39. Smith, E., Hoi, J., Eissenberg, J., Shoemaker, J., Neckameyer, W., Ilvarsonn, A., Harshman, L., Schlegel, V., & Zempleni, J. (2007). Feeding *Drosophila* a biotin-deficient diet for multiple generations increases stress resistance and lifespan and alters gene expression and histone biotinylation patterns. *The Journal of nutrition*, *137*, 2006-12. https://doi.org/10.1093/jn/137.9.2006
40. Sulanc, M., & Emre, I. (2000). Effects of B group vitamins and choline chloride on the development and protein synthesis in the male larve of *Pimpla turionella* L. (Hym., Ichneumonidae). *Journal of Applied Entomology*, *124*, 151.
41. Wang, Y., Ren, F.R., Yao, Y.L., Sun, X., Walling, L.L., Li, N.N., Bai, B., Bao, X.Y., Xu, X.R., & Luan, J.B. (2020). Intracellular symbionts drive sex ratio in the whitefly by facilitating fertilization and provisioning of B vitamins. *ISME Journal*, *14*, 2923–2935. https://doi.org/10.1038/s41396-020-0717-0
42. Yazdanian, M., Farshbaf Pour Abad, R., Rashidi, M.R., Valizadeh, M., & Rashtchi Zadeh, N. (2006). Morphology of the gut and salivary gland of the stripped bug, *Graphosoma lineatum* (Het.; Scutelleridae). *Agricultural Science*, *16*(2), 77-90. (In Persian)
43. Yazdanian, M., Farshbaf Pourabad, R., Rashidi, M.R., Valizadeh, M., & Rashtchizade, N. (2011). Effects of some biological properties of the stripped bug, *Graphosoma lineatum* (L.) (Hem., Scutelleridae) on its salivary alpha-amylase activity. *Plant Protection*, *33*, 49-62. (In Persian with English abstract)
44. Yoshii, K., Hosomi, K., Sawane, K., & Kunisawa, J. (2019). Metabolism of dietary and microbial vitamin B family in the regulation of host immunity. *Frontires in Nutrition*, *6*, 48. https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00048
45. Zanotto, F.P., Simpson, S.J., & Raubenheimer, D. (2010). The regulation of growth by locusts through post-ingestive compensation for variation in the levels of dietary protein and carbohydrate. *Physiological Entomology*, *18*, 425–434.